

NOZNE KRME BLISKOM INFRACRVENOM (NIR) SPEKTROSKOPIJOM

DEVELOPING NEAR-INFRARED (NIR) SPECTROSCOPY CALIBRATION FOR THE PREDICTION OF FORAGE NUTRITIVE VALUE

Marina Vranić, K. Bošnjak, S. Glavanović, T. Mašek

Stručni članak - Profesional paper
Prilinjeno - Received: 19. Prosinac - December 2019

SAŽETAK

Cilj ovog stručnog rada je prikazati osnove razvoja kalibracijskih modela za procjenu fizikalnih, kemijskih i/ili bioloških parametara voluminozne krme bliskom infracrvenom spektroskopijom (NIR spektroskopijom).

U usporedbi s klasičnim kemijskim metodama, NIR spektroskopija je multi-analička, ekološki potpuno prihvatljiva i brza metoda, jednostavna za primjenu i interpretaciju rezultata. Za korištenje NIR spektroskopije u svrhu procjene hranidbene vrijednosti voluminozne krme, neophodne su razvijene kalibracijske jednadžbe. Uzorci korišteni za razvoj primjenjivih kalibracija moraju biti dovoljno slični da pripadaju istom kalibracijskom setu, ali i dovoljno različiti da pokrivaju očekivane fizikalne, kemijske i/ili biološke varijabilnosti uzoraka nepoznatog kemijskog sastava. Razvoj kalibracija se sastoji od niza aktivnosti od prikupljanja/odabira uzoraka i njihove analize klasičnim kemijskim/fizikalnim i/ili biološkim metodama do predobrade i skeniranja uzoraka, razvoja kalibracijske jednadžbe primjenom neke od regresijskih metoda na spektralne podatke uzoraka, te primjene i kontrole razvijenog kalibracijskog modela procjene.

Razvijena kalibracija koja ima stupanj korelacije (R^2) što bliži 1.00, nisku standardnu grešku kalibracije (SEC), standardnu grešku unakrsne validacije (SECV) i standardnu grešku procjene (SEP) može se primjenjivati u praksi.

Daljnja istraživanja su usmjerena na korištenje mobilne NIR spektroskopije za svakodnevnu primjenu na farmama.

Ključne riječi: voluminozna krma, NIR spektroskopija, kalibracija

UVOD

Voluminozna krma je glavni i najvažniji izvor hranjivih tvari za hranidbu preživača (Molano i sur., 2016.). Na hranidbenu vrijednost voluminozne krme utječu brojni čimbenici (Park i sur., 1999.). Kemijski sastav i hranidbena vrijednost voluminozne krme je

osnova programa oplemenjivanja bilja, utvrđivanja mogućih zdravstvenih problema životinja, trgovine voluminoznom krmom, sastavljanja izbalansiranih obroka za hranidbu životinja (Murray, 1993.) te inventarizacije hranidbene vrijednosti i gospodarenja voluminoznom krmom (agrotehnologija uzgoja, proizvodnja, skladištenje) (Dale i sur., 2012.).

Marina Vranić, Krešimir Bošnjak, e-mail: kbosnjak@agr.hr, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zavod za specijalnu proizvodnju bilja, Svetošimunska cesta 25, Zagreb, Hrvatska; Siniša Glavanović, Belupo Inc., Istraživanje i razvoj, Danica 5, Koprivnica, Hrvatska; Tomislav Mašek, Sveučilište u Zagrebu Veterinarski fakultet, Zavod za prehranu i dietetiku životinja, Heinzelova 55, Zagreb, Hrvatska

U usporedbi s klasičnim kemijskim, fizikalnim i/ili biološkim metodama, bliska infracrvena spektroskopija (NIR spektroskopija) je multi-analitička, ekološki potpuno prihvatljiva i brza metoda, jednostavna za primjenu i interpretaciju rezultata.

Nedostaci korištenja NIR spektroskopije u analizi u usporedbi s provedbom klasičnih kemijskih analiza su visoka cijena koštanja aparata, programskih paketa, razvoja kalibracija i edukacije osoblja te nedovoljna osjetljivost na mikro sastavnice.

Cilj ovog stručnog rada je prikazati osnove razvoja kalibracijskih modela za procjenu fizikalnih, kemijskih i/ili bioloških parametara voluminozne krme NIR spektroskopijom.

Osnove NIR spektroskopije

Refleksijska spektroskopija u bliskom infracrvenom području (engl. Near Infrared Reflectance Spectroscopy - NIRS) koristi elektromagnetski spektar valnih duljina u rasponu od 780-2500 nm. NIRS se široko koristi za procjenu organskih i anorganskih komponenti različitih vrsta uzoraka. Bazira se na pozitivnoj korelaciji između kemijskih sastavnica uzoraka koje se utvrđuju klasičnim kemijskim metodama i apsorpciji svjetla na različitim valnim duljinama u NIR području (Murray, 1993.). Tijekom skeniranja uzoraka, dio energije prolazi kroz uzorak (transmisijska energija), dio energije se odbija od uzorka (tzv. reflektirajuća energija), dio upije u uzorak (tzv. apsorpcijska energija), a dio reflektira od uzorka (reflektirajuća energija) (Murray, 1993.). NIR Foss, model 6500, npr. mjeri NIR svjetlo koje se od uzorka odbije pod kutom od 45°.

Princip rada NIR spektroskopije bazira se na kovalentnim vezama C-H, O-H i N-H, kao važnim komponentama organskih tvari (Murray, 1993.). Molekule uzorka apsorbiraju energiju zračenja prema učestalosti određene vibracije što rezultira jedinstvenim spektralnim prikazom uzorka (Ibáñez i Alomar, 2008.). Sve organske veze, kao što su C-H, N-H i O-H, imaju apsorpcijska svojstva u NIR području (Osborne, 2000.), pa NIRS može detektirati veze frakcija npr. masti, proteina i ugljikohidrata u krmi (Ibáñez i Alomar, 2008.).

Važnost kalibracija za procjenu hranidbene vrijednosti voluminozne krme NIR spektroskopijom

Kalibracije predstavljaju osnovu korištenja NIR spektroskopije za procjenu hranidbene vrijednosti voluminozne krme. Pridruživanjem kalibracija uspostavljena korelacija između spektra i referentnih karakteristika uzoraka može se transferirati u egzaktnu podatke (Shenk i Westerhaus, 1996.) čime se primjenjuje model spektrometrijske procjene. Cilj razvoja kalibracijskih modela je što preciznije i točnije, odnosno sa što višim stupnjem pouzdanosti procijeniti sadržaj svakog pojedinog fizikalnog/kemijskog i/ili biološkog parametra u uzorku (Murray i Cowe, 2004.). Jednadžba kalibracije za NIR aparat se razvija iz kalibracijskog skupa podataka (Landau i sur., 2006.). Razvoj jednadžbi kalibracije se provodi korištenjem "kemometrije", odnosno, kemijske discipline koja se služi matematičkim i statističkim metodama da bi optimalno projektirale i odabrale mjeriteljske procedure i postupke te da bi dobili maksimalan broj informacija analiziranjem početnog seta podataka (Mathias, 2007.).

Razvoj kalibracija za NIR spektroskopiju obuhvaća sljedeće:

1. Definiranje vrste uzoraka čime se određuje vrsta kalibracije;
2. Određivanje područja prikupljanja uzoraka čime se određuje tip kalibracije (globalna ili lokalna);
3. Prikupljanje uzoraka različitog podrijetla (u smislu tla, klime, fenološke faze uzgoja, gnojide itd.);
4. Pripremanje uzoraka za skeniranje (sušenje, mljevenje, dosušivanje, punjenje u kivetu);
5. Skeniranje uzoraka na NIR aparatu;
6. Odabiranje manjeg broja reprezentativnih uzoraka (na temelju spektralne varijacije), koji pokrivaju ukupnu varijabilnost;
7. Analiziranje odabranih uzoraka klasičnim kemijskim i/ili fizikalnim metodama i/ili provedba bioloških istraživanja u cilju dobivanja referentnih podataka;
8. Pridruživanje rezultata referentnih vrijednosti prikupljenim spektralnim rezultatima

9. Razvijanje kalibracijske jednadžbe modeliranjem spektralnih rezultata s rezultatima referentnih analiza tj. primjenom jedne ili više regresijskih metoda
10. Validiranje jednadžbe – korištenje spektara seta uzoraka, po mogućnosti s druge lokacije, koji su analizirani klasičnim kemijskim metodama (Molano i sur., 2016).
11. Praćenje rezultata procjene – razvijeni kalibracijski model se koristi uz kontinuiranu kontrolu.

Za pouzdanost NIRS-a, kao analitičke tehnike, jednako važno je i uzorkovanje, priprema uzoraka (npr. sušenje, mljevenje, dosušivanje) i tehnika skeniranja (razina punjenja kivete, zbijenost uzorka u kiveti, zatvaranje kivete.) (Cozzolino i sur., 2003; Roberts i sur., 2004; Murray i Cowe, 2004.).

Za razvoj kalibracije se koriste laboratorijske vrijednosti, dobivene provedbom klasičnih kemijskih, fizikalnih i/ili bioloških analiza, koje moraju biti precizne i točne o čemu ovisi i preciznost i točnost razvijenog kalibracijskog modela kao i njegova primjenjivost u praksi (Murray i Cowe, 2004.).

Parametri hranidbene vrijednosti voluminozne krme

Osnovni kemijski parametri hranidbene vrijednosti voluminozne krme uključuju sadržaj suhe tvari (ST), sirovih proteina (SP), organske tvari (OT), odnosno pepela, neutralnih deterdžent vlakana (NDV) i kiselih deterdžent vlakana (KDV). Za uzorke fermentirane voluminozne krme još je značajna kvaliteta fermentacije u silosu, odnosno pH vrijednost, sadržaj amonijskog N ($\text{NH}_3\text{-N}$), alkohola i kiselina nastalih fermentacijom (mliječna, maslačna, octena, propionska), a za uzorke kukuruzne silaže sadržaj škroba (Chamberlain i Wilkinson, 1996).

Razvijene kalibracije za NIR aparat mogu uključivati i druge kemijske parametre hranidbene vrijednosti voluminozne krme poput sadržaja metaboličke energije (ME), i biološke parametre hranidbene vrijednosti poput probavljivosti OT, ST ili bilo kojeg kemijskog parametra, razgradivosti SP u buragu preživača (razgradivi SP), faktora konzumacije za goveda, faktora konzumacije za ovce, a za fermentiranu krmu sadržaj korigirane ST (KST), udio energije iz krme dostupne za mikrobe buraga (FME/ME) te sadržaj rezidua šećera u fermentiranoj voluminoznoj krmi (Vranić i sur., 2004., 2005.b).

Teoretski, NIR spektroskopijom se u voluminoznoj krmi može procijeniti bilo koji parametar (i organski i anorganski). Ograničenje može predstavljati preniska koncentracija pojedinog kemijskog parametra (niža od 0,1% u ST) koja nakon skeniranja može biti „sakrivena“ u spektrima, pa se ne može očitati (Liu i Han, 2006).

Odabir uzoraka za razvoj kalibracije

Jednadžba kalibracije se razvija iz kalibracijskog skupa podataka (Landau i sur., 2006.). Uzorci koji se koriste za razvoj kalibracijskih modela moraju biti dovoljno slični da pripadaju istoj vrsti uzoraka (npr. sijeno, sjenaža.), ali i dovoljno različiti da pokrivaju moguće varijacije pojedinih parametara koji se procjenjuju (Stuth i sur., 2003.).

Kod razvoja kalibracija za voluminoznu krmu, dobro je uključiti varijacije hranidbene vrijednosti krme unutar vegetacijske sezone, pa razvijati kalibracije čak za svako godišnje doba i unutar godišnjeg doba čime se povećava preciznost NIR spektroskopije u analitičke svrhe (Garacia i Cozzolino, 2006; Andueza i sur., 2016.).

Broj uzoraka voluminozne krme za razvoj kalibracije na NIR aparatu

Voluminozna krma je heterogena jer se sastoji od različitog udjela i fenološke zrelosti pojedinih biljnih vrsta (trave, djeteline, zeljanice) i pojedinih komponenti biljke (list, vlat, cvat, sjeme). Na varijabilnost hranidbene vrijednosti voluminozne krme utječe niz čimbenika, od vrste tla i odabira sjemena za sjetvu preko tehnologije uzgoja usjeva do faze fenološke zrelosti usjeva prilikom košnje, tehnologije konzerviranja i skladištenja (Park i sur., 1999.). U tablici 1 je prikazana hranidbena vrijednost triju najčešćih vrsta konzervirane voluminozne krme (sijeno, travna silaža/sjenaža i kukuruzna silaža).

U tablici 1 su vidljive varijacije bioloških i kemijskih parametara hranidbene vrijednosti konzervirane voluminozne krme te parametara kvalitete fermentacije fermentirane voluminozne krme. Dobro razvijena kalibracija za npr. procjenu sadržaja ST u travnoj silaži bi trebala obuhvatiti uzorke koji sadrže od 170-700 g ST kg^{-1} svježeg uzorka (tablica 1). Broj uzoraka koji se koristi za razvoj kalibracije nije od presudne važnosti. U ranijim istraživanjima je za razvoj kalibracija za procjenu hranidbene vrijednosti voluminozne krme NIR spektroskopijom korišteno

Tablica 1 Hranidbena vrijednost konzervirane voluminozne krme (Chamberlain i Wilkinson, 1996., Vranić i sur., 2004., 2005.a,b.) (u g kg⁻¹ ST ako nije drugačije navedeno)

Table 1 Feeding value of conserved forage (Chamberlain i Wilkinson, 1996., Vranić i sur., 2004., 2005.b) (in g kg⁻¹ DM if not otherwise stated)

Parametar/parameter	Sijeno/Hay	Travna silaža/sjenaža Grass silage/haylage	Kukuruzna silaža/ Maize silage
ST/DM (g kg ⁻¹ svježeg uzorka/fresh sample)	750-920	170-700	200-450
SP/CP	40-190	70-280	50-90
NDV/NDF	320-550	350-600	250-420
ADV/ADF	220-380	180-400	200-300
ME (MJ kg ⁻¹ ST/DM)	8-12	8-12	9-13
CHO/WSC	10-120	0-40	-
Razgradivi SP/degradable CP	-	0,5-0,9	-
D-vrijednost/value	450-720	400-750	550-800
FME/ME	-	0,5-0,9	0,5-0,8
NH ₃ -N (g N kg ⁻¹ ukupnog/total N)	-	20-350	20-200
pH	-	3,8-5,8	3,5-4,8
Škrob/Starch	-	-	220-400
Ostatci šećera/sugar residues	-	40-180	-
Mliječna kiselina/Lactic acid	-	20-200	60-250

ST, suha tvar; SP, sirovi proteini; NDV, neutralna deterdžent vlaknina; KDV, kisela deterdžent vlaknina; ME, metabolička energija; CHO, ugljikohidrati topivi u vodi; Razgradivi SP, sirovi proteini razgradivi u buragu životinja; D-vrijednost, probavljivost organske tvari u suhoj tvari uzoraka; FME/ME, fermentirajuća metabolička energija u metaboličkoj energiji tj. energija dostupna za mikrobe buraga; NH₃-N, amonijski dušik
DM, dry matter, CP, crude protein; NDF, neutral detergent fibre; ADF, acid detergent fibre; ME, metabolic energy, WSC, water soluble carbohydrates; degradable CP, CP degradable in rumen; D-value, the digestibility of the organic matter in the dry matter; FME/ME, fermentable metabolic energy in the metabolic energy; NH₃-N, ammonium nitrogen.

od 43 uzorka travne silaže za procjenu pH vrijednosti (Sørensen, 2004.) do 1941 uzorak monokulture engleskog ljlja za procjenu sadržaja SP (Burns i sur., 2014.). Durmic i sur. (2017.) su za razvoj kalibracijske jednadžbe u uzorcima voluminozne krme koristili 1231 uzorak za procjenu sadržaja N, 427 uzoraka za procjenu sadržaja vlakana NDV, 402 uzorka za procjenu sadržaja KDV i 405 uzoraka za procjenu *in vitro* razgradivosti ST. Parrini i sur. (2018.) su razvili pouzdan kalibracijski model za procjenu kemijskog sastava prirodnih i poluprirodnih pašnjaka u Toskani (Italija) korištenjem samo 105 uzoraka. S obzirom na rezultate istraživanja, primjenjiva kalibracija za voluminoznu krmu može sadržavati i manje od 100 uzoraka za procjenu samo nekih jednostavnijih parametara poput sadržaja vlage ili dušika (Murray, 1993.).

Priprema uzoraka voluminozne krme za razvoj kalibracije

Voluminozna se krma može skenirati svježa, osušena ili osušena i samljevena, a svaki način pripreme uzorka rezultira različitim spektralnim podacima (Ulyatt i sur., 1995.) pa se mora ranije precizirati. Uvjeti i procedure rada kod razvoja kalibracija moraju biti standardizirani s uvjetima i procedurama rada kod primjene kalibracija (Stuth i sur., 2003.), a uključuju temperaturu i duljinu sušenja uzoraka, veličinu čestica mljevenja, temperaturu i duljinu došivanja uzoraka, duljinu i način hlađenja uzoraka te razinu punjenja i način zatvaranja kivete za skeniranje uzoraka. Standardizacijom uvjeta i procedura rada povećava se pouzdanost (preciznost i točnost) rezultata procjene (Reddersen i sur., 2013.).

Idealno bi bilo razvijati kalibracije za svježe uzorke, bez prethodne pripreme, u kojem bi se slučaju i uzorci iste vrste voluminozne krme, ali nepoznatog kemijskog sastava mogli skenirati u svježem obliku. Time bi se ubrzalo i pojeftinilo korištenje NIR spektroskopije u analitičke svrhe na mjestu proizvodnje (Fernandes, 2015) ili u programima oplemenjivanja bilja kada se analizira velik broj uzoraka (Cozzolino i Labandera, 2002.). Razvijeni kalibracijski modeli za uzorke svježe voluminozne krme pokazuju visoku pouzdanost u procjeni ST, N i SP (Cozzolino i Labandera, 2002).

Međutim, teže je prikupiti i manipulirati s dovoljnim brojem svježih uzoraka. Osim toga, kalibracije razvijene na prethodno pripremljenim uzorcima (osušenim, dosušanim) su preciznije budući da voda snažno apsorbira NIR svjetlost i time utječe na dobiveni spektar, a heterogenost svježeg uzorka voluminozne krme još jače dolazi do izražaja (Murray i Cowe, 2004.).

Zbog navedenog, NIR spektroskopija za uzorke voluminozne krme uključuje prikupljanje spektralnih podataka za razvoj kalibracija iz prethodno standardno pripremljenih uzoraka. To podrazumijeva sušenje uzoraka voluminozne krme na temperaturi od 60°C tijekom 48 sati (do konstantne mase uzoraka), mljevenje uzoraka na veličinu čestica promjera 1mm, dosušivanje min 3 sata na temperaturi od 105°C, hlađenje u eksikatoru (cca 10-15 min) i naposljetku skeniranje uzoraka (Murray, 1993.).

Metode modeliranja spektralnih podataka

Za modeliranje spektralnih rezultata s rezultatima referentnih analiza, za voluminoznu krmu se najčešće primjenjuje neka od regresijskih metoda poput analize glavnih komponenata (PCA), regresije glavnih komponenata (PCR), višestruke linearne regresije (MLR), metode parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS), modificirane metode parcijalnih najmanjih kvadrata (MPLS), diskriminirajuće metode parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS-DA), linearne diskriminirajuće metode (LDA), podrške vektora (SVM), umjetne neuronske mreže (ANN), površnog neovisnog modeliranja analogne klase (SIMCA), pomaka osnovne linije (BLS) i metode spektralne informacije i divergencije (SID) (Garacia i Cozzolino, 2006, Murry i Cowe, 2004).

Za modeliranje spektralnih rezultata i rezultata referentnih analiza za voluminoznu krmu najčešće se primjenjuje metoda najmanjih kvadrata (PLS,

partial least square) koja pomoću interne unakrsne validacije (cross-validacija) optimizira broj PLS faktora za korištenje (Murry i Cowe, 2004.).

Pouzdanost razvijenog kalibracijskog modela

Jednadžba kalibracije se razvija iz kalibracijskog skupa podataka (Landau i sur., 2006.) uspostavom matematičkog odnosa između spektralnih podataka i podataka referentnih analiza korištenjem neke od gore navedenih kemometrijskih regresijskih metoda. Pod pojmom pouzdanosti razvijenog NIR kalibracijskog modela za procjenu kemijskog sastava uzoraka podrazumijeva se preciznost i točnost modela. Preciznost razvijenog NIR kalibracijskog modela se utvrđuje koeficijentom determinacije (R^2), odnosno, jačinom linearne povezanosti referentnih rezultata i rezultata procijenjenih NIR spektroskopijom za pojedine parametre obuhvaćene jednadžbom regresije (Landau i sur. 2006.). Točnost razvijenog kalibracijskog modela je označena standardnom greškom kalibracije (SEC), standardnom greškom (unakrsne) validacije (SECV) i standardnom greškom procjene (SEP) (Shenk i sur., 2001.).

U tablici 2 su prikazani razvijeni kalibracijski modeli za kemijski sastav sjenaže.

Vrijednost R^2 može iznositi od 0 do 1, a što je bliža broju 1, to je rezultat precizniji (Sohn i sur. 2006.). Williams i Sobering (1996.) navode da je NIR kalibracijski model: (i) niske razine preciznosti ako je $R^2 = 0,3 - 0,49$; (ii) pogodan za grubu procjenu ako je $R^2 = 0,50-0,69$; (iii) prihvatljiv za procjenu ako je $R^2 = 0,7-0,9$; (iv) te visoke preciznosti ako je $R^2 > 0,9$. Vrijednost $R^2 = 1$ označava da se svi uzorci nalaze na regresijskoj liniji, odnosno da kalibracijska jednadžba 100% obuhvaća predviđene varijacije uzoraka (Shenk i sur., 2001.). Prikazani razvijeni kalibracijski modeli (tablica 2) su prihvatljivi za procjenu ili su visoke preciznosti (Williams i Sobering, 1996).

SEC označava varijabilnost između procjene određenog parametra NIR spektroskopijom i referentne vrijednosti za isti parametar nakon razvoja kalibracijskog modela (Stuth i sur., 2003.). Razvijenu kalibraciju koja ima visoki R^2 i SEC uobičajeno se validira pomoću spektara nezavisnog validacijskog seta uzoraka (Molano i sur., 2016.) radi utvrđivanja točnosti procjene razvijenog modela (Stuth i sur., 2003.). Točnost modela se ocjenjuje standardom greškom procjene (SEP) koja ukazuje na razlike procijenjenih vrijednosti NIR spektroskopijom

Tablica 2. Kalibracijski modeli za sjenažu

Table 2 The calibration models for haylage

n	R ²	SEC	SECV	SEP	Autor/Author
Suha tvar/Dry matter					
120	0.80	-	6,70	-	Ernesto i sur. (2009.)
103	0,90	-	-	29,74	Vranić i sur. (2005.b)
Pepeo/Ash					
920	0.93	4.17	5.14	-	Ibáñez i Alomar (2008.)
136	0.95	1.04	1.70	-	Park i sur. (1998.)
Sirovi proteini/Crude proteins					
136	0.98	-	-	0.14	Park i sur. (1998.)
920	0.97	5.75	6.69	-	Ibáñez i Alomar (2008.)
103	0,95	-	-	0,31	Vranić i sur. (2005.b)
Neutralna deterdžent vlaknina/Neutral detergent fibre					
920	0.96	14.01	16.00	-	Ibáñez i Alomar (2008.)
136	0.95	4.53	5.35	-	Park i sur. (1998.)
Kisela deterdžent vlaknina/Acid detergent fibre					
920	0.97	7.90	9.15	-	Ibáñez i Alomar (2008.)
136	0.92	3.81	4.12	-	Park i sur. (1998.)
120	0,80	-	4,00	-	Ernesto i sur. (2009.)
pH vrijednost/pH value					
920	0.78	0.12	0.14	-	Ibáñez i Alomar (2008.)
136	0.98	0.06	0.11	-	Park i sur.(1998.)
120	0,70	-	0,34	-	Ernesto i sur. (2009.)

n, broj uzoraka; R², korelacija; SEC, standardna greška kalibracije; SECV, standardna greška unakrsne validacije; SEP, standardna greška procjene/
 n, number of samples; R², degree of correlation; SEC, standard error of calibration; SECV, standard error of cross-validation, SEP, standard error of prediction

između ponovljenih skeniranja (Murry, 1993; Williams i Sobering, 1996.). SEP se uvelike oslanja na točnost provedenih laboratorijskih kemijskih analiza nezavisnog (validacijskog) seta uzoraka (Shenk i sur., 2001.). Vrijednost SEP bi trebala biti što niža, slična SEC i standardnoj devijaciji (SD) referentnih vrijednosti validacijskog uzorka.

Nakon provedene validacije jednadžbe, jedan od pokazatelja primjenjivosti modela je standardna greška unakrsne validacije (SECV) koja u dobro razvijenom kalibracijskom modelu treba biti što niža, a u približno istim vrijednostima SEC-a.

Primjenjiva je razvijena kalibracija koja ima stupanj korelacije (R²) što bliži 1.00 i niske vrijednosti SEC-a, SECV-a i SEP-a je (Landau i sur., 2006.).

U praktičnim se uvjetima NIR spektroskopija primjenjuje uz korištenje H statistike (Mahalanobis

distance) čime se minimalizira ili isključuje pogreška procjene prilikom primjene modela (Martens i Naes, 2001.).

Oprema i novi razvoj

Za procjenu hranidbene vrijednosti voluminozne krme u SAD-u su se prije 30ak godina, osim korištenja laboratorijske NIR spektroskopije, počele koristiti i NIR tehnike bespilotnih letjelica ili kamere za traktore, odnosno kombajne (Saari i sur., 2017.).

Fan i sur. (2018.) su utvrdili prihvatljive vrijednosti procjene, s obzirom na točnost i pouzdanost korištenja NIR sustava kamera za procjenu indeksa površine listova krmnog bilja u fazi intenzivnog porasta. NIR tehnologija se može povezati s različitim vrstama vozila (npr. traktori, kamioni) radi lakšeg donošenja odluka poput početka napasivanja, košnje usjeva i sl.

ZAKLJUČAK

NIR spektroskopija se uobičajeno koristi za procjenu hranidbene vrijednosti krme za hranidbu životinja prvenstveno radi sastavljanja obroka i planiranje proizvodnje. Neprekidno se razvijaju/nadograđuju kalibracije za procjenu parametara hranidbene vrijednosti voluminozne krme. Ograničenja NIR spektroskopije za razvoj preciznih i točnih kalibracijskih jednadžbi se mogu prevenirati ili ublažiti poštivanjem točnih procedura razvoja kalibracije od prikupljanja/odabira uzoraka i njihove analize klasičnim kemijskim metodama do primjene jednadžbe u praksi i kontrole razvijenog modela procjene.

Daljnja istraživanja su usmjerena na korištenje mobilne NIRS tehnologije za svakodnevnu primjenu na farmama.

LITERATURA

1. Andueza, D., Picard, F., Martin-Rosset, W., Aufrère, J. (2016.): Near-Infrared Spectroscopy Calibrations Performed on Oven Dried Green Forages for the Prediction of Chemical Composition and Nutritive Value of Preserved Forage for Ruminants. *Applied Spectroscopy*, Thousand Oaks, v. 70, n. 8, p. 1321-1327.
2. Burns, G.A., Gilliland, T.J., Grogan, D., O'Kiely, P. (2014.): A note on the comparison of three near infrared reflectance spectroscopy calibration strategies for assessing herbage quality of ryegrass. *Irish Journal of Agriculture and Food Research* 53, 199-204
3. Chamberlain, A.T., Wilkinson, J.M. (1996.): *Feeding the Dairy Cow*. Chalcombe Publications, PainShall, Ln2 3LT, UK.
4. Cozzolino, D., Labandera, M. (2002.): Determination of dry matter and crude protein contents of undried forages by near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Hoboken, v. 82, p. 380-384.
5. Cozzolino, D., Fassio, A., Fernández, E. (2003.): Uso de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano para el análisis de calidad de ensilaje de maíz. *Agric. Tec. (Chile)* 63:387-394.
6. Dale, L.M., Thewis, A., Boudry, C., Rotar, I., Dardenne, P., Baeten, V., Fernandez Pierna, J.A. (2012.): Hyperspectral imaging applications in agriculture and agro-food product quality and safety control: A Review, *Applied Spectroscopy Reviews*, 48:2,142-159
7. Durmic, Z., Ramírez-Restrepo, C. A., Gardiner, C., O'Neill, C. J., Hussein, E.; Vercoe, P. E. (2017.): Differences in the nutrient concentrations, in vitro methanogenic potential and other fermentative traits of tropical grasses and legumes for beef production systems in northern Australia. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Hoboken, v. 97, n. 12, p. 4075-4086.
8. Ernesto, A., Enrique, R., Fernández, G., La Manna, A., Cozzolino, D. (2009.): Prediction of the nutritive value of pasture silage by near infrared spectroscopy (NIRS). *Chilean Journal of Agricultural Research*, 69(4):560-566.
9. Fan, X., Kawamura, K., Guo, W., Xuan, T. D., Lim, J., Yuba, N., Kurokawa, Y., Obitsu, T., Lv, R., Tsumiyama, Y., Yasuda, T.; Wang, Z. (2018.): A simple visible and near-infrared (V-NIR) camera system for monitoring the leaf area index and growth stage of Italian ryegrass. *Computers and Electronics in Agriculture*, Amsterdam, v. 144, p. 314-323.
10. Fernandes, A. M. F. (2015.): *Uso da espectroscopia de reflectância do infravermelho próximo (NIRS) para previsão da composição bromatológica de vagens de algaroba e palma forrageira*. 2015. 106 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral, 2015.
11. Garacia, J., Cozzolino, D. (2006.): Use of near infrared reflectance (NIR) spectroscopy to predict chemical composition of forages in broadband calibration models. *Agricultura Técnica*, Chillán, 66: 41-47.
12. Ibáñez, L. S., Alomar, D. (2008.): Prediction of the chemical composition and fermentation parameters of pasture silage by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). *Chilean Journal of Agricultural Research*, Chillán, v. 68, n. 4, p. 352-359.
13. Landau, S., Glasser, T., Dvash, L. (2006.): Monitoring nutrition in small ruminants with the aid of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) technology: a review. *Small Ruminant Research*, Amsterdam, v. 61, p. 1-11.
14. Liu, X., Han, L. (2006.): Evaluation of near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for predicting chemical composition of straw silage. *J. Anim. Feed Sci.*; 15 (2) :329–336
15. Martens, H., Naes, T. (2001.): *Multivariate calibration*. Chichester, UK: Wiley.
16. Mathias O: *Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*. Wiley – VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2007.
17. Murray, I. (1993.): Forage analysis by near infrared spectroscopy. In: Davies, A., Baker, R. D., Grant, S. A., Laidlaw, A. S. (eds.). *Sward management handbook*. 2. ed. Reading, UK: The British Grassland Society, p. 285-312.

18. Murray, I., Cowe, I. (2004.): Sample preparation. p. 75-115. In Roberts, C.A., J. Workman, and J.B. Reeves III (eds.) Near infrared spectroscopy in agriculture. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA.
19. Molano, M. L., Cortés, M. L., Ávila, P., Martens, S. D., Muñoz, L. S. (2016.): Ecuaciones de calibración en espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) para predicción de parámetros nutritivos en forrajes tropicales. *Tropical Grasslands/Forrajes Tropicales*, Cali, 4:3:139-145.
20. Osborne, B. (2000.): Near-infrared spectroscopy in food analysis. In: MEYERS, R. A. (ed.). *Encyclopedia of analytical chemistry*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 1-14.
21. Parrini, S., Acciaioli, A., Crovetto, A., Bozzi, R. (2018.): Use of FT-NIRS for determination of chemical components and nutritional value of natural pasture. *Italian Journal of Animal Science*, Abingdon, 17:1:87-91.
22. Park, R.S., Agnew, R.E., Gordon, F.J., Steen, R.W.J (1998.) The use of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) on undried samples of grass silage to predict chemical composition and digestibility parameters. *Animal Feed Science and Technology*. Volume 72, Issues 1–2, May 1998, Pages 155-167
23. Park, P.S., Agnew, R.E., Gordon, F.J., Barnes, R.J. (1999.): The development and transfer of undried grass silage calibrations between near infrared reflectance spectroscopy instruments. *Anim. Feed Sci. Technol.* 78:325-344.
24. Reddersen, B., Fricke, T., Wachendorf, M. (2013.) Effects of sample preparation and measurement standardization on the NIRS calibration quality of nitrogen, ash and NDFom content in extensive experimental grassland biomass. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, 183:77-85.
25. Roberts, C.A., Stuth, J., Flinn, P.C. (2004.): Analysis of forages and feedstuffs. p. 231-269. In Roberts, C.A., J. Workman, and J.B. Reeves (eds.) Near infrared spectroscopy in agriculture. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA.
26. Saari, H., Akujärvi, A., Holmlund, C., Ojanen, H., Kaivosoja, J., Nissinen, A., Niemeläinen, O. (2017.): Visible, very near ir and short wave ir hyperspectral drone imaging system for agriculture and natural water applications. *Remote Sensing and Spatial Information Sciences*, Jyväskylä, v. XLII-3/W3, p. 165-170.
27. Shenk, J.S., Westerhaus, M.O. (1996.): Calibration the ISI way, in *NearInfrared Spectroscopy: The Future Waves*, ed. by Davies AMC and Williams PC. NIR Publications, Chichester, 198–202.
28. Shenk, J.S., J.J. Workman; M.O. Westerhouse (2001.): Application of NIR spectroscopy to Agricultural Products. In: *Handbook of Near-Infrared Analysis*, second edition, edited by Burns, D.A. and E.W. Ciurczak, 419-497.
29. Sohn, M., Himmelsbach, D.S., Morrison, W.H., Akin, D.E., Barton, F.E. (2006.): Partial Least Squares Regression Calibration for Determining Wax Content in Processed Flax Fiber by 14 Near-Infrared Spectroscopy. *Society for Applied Spectroscopy*. 60: 437-440.
30. Sørensen, L. K. (2004.): Prediction of Fermentation Parameters in Grass and Corn Silage by Near Infrared Spectroscopy. *J. Dairy Sci.* 87:3826–3835
31. Stuth, J., Jama, A., Tolleson, D. (2003.) Direct and indirect means of predicting forage quality through near infrared reflectance spectroscopy. *Field Crops Research*, Amsterdam, v. 84, p. 45-56.
32. Ulyatt, M.J., Lee, J., Corson, D. (1995.): Assessing feed quality. *Ruakura Farmers Conference*. 47; 59–62.
33. Vranić, M., Knežević, M., Perčulija, G., Leto, J., Bošnjak, K., Rupić, I. (2004.): Kvaliteta voluminozne krme na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima u Republici Hrvatskoj. Kvaliteta travne silaže na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima. *Mljekarstvo* 54(3):165-174.
34. Vranić, M., Knežević, M., Seregély, Z., Bošnjak, K., Leto, J., Perčulija, G. (2005.a) Prediction of Dry Matter and Crude Protein Content in Fresh Grass Silage by Near Infrared Spectroscopy. *Progress in Agricultural Engineering Sciences*. 1; 57-75.
35. Vranić, M., Knežević, M., Leto, J., Perčulija, G., Bošnjak, K., Kutnjak, H., Maslov, L. (2005.b): Kvaliteta voluminozne krme na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima u Republici Hrvatskoj: Monitoring kvalitete kukuruzne silaže tijekom dvije sezone zimske hranidbe muznih krava. *Mljekarstvo* 55(4): 269-282.
36. Williams, P.C., Sobering, D.C. (1996.): How do we do it: A brief summary of the methods we use in developing near infrared calibrations, in *Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves*, ed. By Davies AMC and Williams PC. NIR Publications, Chichester, 185–188.

SUMMARY

The aim of this article is to present the basics of the development of calibration models for the estimation of the physical, chemical and / or biological parameters of forage by NIR spectroscopy.

Compared to conventional chemical methods, NIR spectroscopy is a multi-analytical, environmentally friendly and fast method, easy to apply and interpret results. For the use of NIR spectroscopy for the prediction of the nutritional value of forages, developed calibration equations are necessary. The samples used to develop applicable calibrations must be similar enough to belong to the same calibration set but also sufficiently different to cover the expected physical, chemical and / or biological variability of samples of unknown chemical composition. Calibration development consists of a range of activities from collecting / selecting samples and analyzing them by classical chemical / physical and / or biological methods to pre-processing and scanning, developing a calibration equation and finally applying and controlling the developed calibration prediction model.

A developed calibration with a degree of correlation (R^2) closer to 1.00, a low standard error of calibration (SEC), a standard error of cross-validation (SECV), and a standard error of prediction (SEP) can be applied in practice.

Further research is focused on the use of mobile NIR spectroscopy for daily on-farm application.

Keywords: forage, NIR spectroscopy, developing calibration